

水提苦瓜多糖的分离纯化及组成性质研究

董英, 徐斌, 陆琪, 查青

(江苏大学生物与环境工程学院, 江苏 镇江 212013)

摘要: 目的: 从苦瓜中分离水溶性苦瓜多糖, 并研究其组成性质。方法: 采用 DEAE 纤维素柱层析和凝胶柱层析分离纯化得到苦瓜多糖 MCP₂ 和 MCP₄, Sepharose CL-6B 凝胶柱层析和醋酸纤维膜电泳检测证明为均一组分。气相色谱法和薄层层析法测定其多糖组成, 凝胶过滤法测定其相对分子质量, 红外光谱测定其糖苷键类型。结果: 苦瓜多糖 MCP₂ 为半乳糖, MCP₄ 含有鼠李糖、木糖、半乳糖和阿拉伯糖, 它们的摩尔比为 1:0.75:1.83:0.85。平均相对分子质量分别为 5.37×10^4 , 9.65×10^4 。它们的红外光谱中有典型的多糖吸收峰, 紫外扫描无核酸和蛋白特征吸收峰。结论: MCP₂, MCP₄ 首次从苦瓜中提取获得, 为均一多糖组分。

关键词: 苦瓜; 多糖; 分离; 纯化; 组成

Studies on the Isolation, Purification and Composition of *Momordica charantia* L. Polysaccharide

DONG Ying, XU Bin, LU Qi, ZHA Qing

(School of Biological and Environmental Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Objective: To study the isolation, purification and composition of *Momordica charantia* L. polysaccharide (MC). Methods: MC was purified by DEAE ion-exchange cellulose (DEAE-52) and Sephadex G-100. The components of the saccharide were determined by GC and TLC. Its MW was measured by gel filtration. The form of glucosidic bond was determined by IR. Results: Rhamnose, xylose, galactose, and arabinose were found in MCP₄ with the molar ratio of 1:0.75:1.83:0.85 while galactose was found in MCP₂. Their average MWs were estimated respectively to be 5.37×10^4 and 9.65×10^4 . Typical absorption of polysaccharide was shown in their IR spectrum. They had no typical absorption of nucleic acid or protein by UV scanning. Conclusion: MCP₂ and MCP₄ are first isolated from *Momordica charantia* L.

key words: *Momordica charantia* L.; polysaccharide; isolation; purification; composition

中图分类号: Q539

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)11-0115-05

苦瓜因具特殊苦味而得名, 苦瓜在世界许多国家和地区都有入药记载, 苦瓜全株, 特别是种子和果实具有很强的生理活性, 具有明显的降血糖、抗肿瘤、杀精和堕胎等药理作用^[1]。从苦瓜中已分离得到的化学成分包括三萜、甾类、生物碱、蛋白、有机酸及多糖类等。但对其生物大分子活性物质多糖的分离纯化及其组成性质的研究尚未见报道, 本文以苦瓜为原料, 进行了水溶性苦瓜多糖分离与纯化方法的研究, 同时对苦瓜多糖的组成性质进行了初步的分析。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

苦瓜 扬州绿健苦瓜种植基地。

试剂: L-鼠李糖、D-阿拉伯糖、D-甘露糖、D-葡萄糖、D-半乳糖、D-木糖、Sephadex CL-6B 美国 Sigma 公司; DEAE-52 纤维素 Whatman 公司; Sephadex G-100、蓝色葡聚糖、葡聚糖-90、葡聚糖-70、葡聚糖-40、葡聚糖-10 瑞典 Pharmacia 公司; 乙醇、丙酮、乙醚、乙酸乙酯、醋酸酐、甲苯、氯仿、吡啶、乙酸、异丙醇、正丁醇、NaOH、NaCl、BaCO₃、KCl、肌醇、盐酸羟胺、浓硫酸、硼酸、甲苯胺兰、钼酸铵、茚三酮、碘、碘化钾、苯氨、邻苯二甲酸均为国产分析纯。

仪器: 电子天平 德国 Sartorius; 4890D 型气相色谱仪 美国 Agilent 公司; NEXUS 670 智能型傅里叶红外光谱仪 美国尼高利公司; 紫外可见近分光系统 美

收稿日期: 2004-12-29

基金项目: 江苏省科技攻关项目 (BE2004360)

作者简介: 董英 (1954-), 女, 教授, 博导, 研究方向为食品生物技术。

国瓦里安公司; LD5-2A 离心机 北京医用离心机厂; 层析柱、恒流泵、自动分部收集器 上海沪西仪器厂; 旋转蒸发仪、鼓风干燥箱、真空干燥箱、恒温水浴锅等。

1.2 实验方法

1.2.1 苦瓜多糖的提取、分离、纯化

苦瓜多糖的提取、分离流程^[2]:

鲜苦瓜 去籽 切片 干燥 粉碎 乙醇回流 热水浸提 过滤 澄清液 浓缩液 醇析 洗涤 干燥 苦瓜粗多糖 脱蛋白 透析 离心分离 减压浓缩 醇析 离心分离 脱水干燥 精制苦瓜多糖

原材料预处理: 鲜苦瓜洗净、去瓢、切成薄片, 放入热风干燥箱内进行脱水干燥, 干燥箱内温度控制在 50℃ 以下。干燥的苦瓜经粉碎后, 过 40 目筛, 得苦瓜粉。称取 500g 苦瓜粉, 用 1500ml 95% 乙醇、60℃ 回流提取 2 次, 每次 6h。滤液经蒸馏回收乙醇, 残渣风干后用于多糖提取。

提取: 精确称取经预处理的苦瓜粉 100g, 加 2000ml 蒸馏水, 40℃、2h 搅拌提取, 重复 3 次。

过滤、浓缩: 提取液真空过滤, 去除残渣, 得澄清液。再将澄清液于 50℃ 真空浓缩, 浓缩为原体积的五分之一, 加入 4 倍提取液体积的 95% 乙醇溶液, 冰箱放置过夜。

脱蛋白: 沉淀用蒸馏水溶解, 磁力搅拌机搅拌, 使之充分复溶。Sevage 法去蛋白, 按多糖溶液: 氯仿: 正丁醇=1:0.2:0.04 的比例混匀, 4000r/min 离心 15min, 反复 12 次, 直至于 260nm 和 280nm 处没有明显光吸收为止。

透析: 脱蛋白后的浓缩液用流动自来水透析 72h, 蒸馏水透析 24h。透析液 3000r/min 离心, 加 4 倍量 95% 乙醇沉淀, 过夜, 4000r/min 离心 15min。

脱水干燥: 沉淀加无水乙醇混匀, 4000r/min 离心 15min, 重复 3 次, 再分别用丙酮、乙醚洗涤 2 遍, 真空干燥, 最后得浅黄色、粉状苦瓜多糖粗品。

1.2.2 苦瓜多糖的分级

苦瓜多糖粗品 水溶 DEAE-52 纤维素层析 SephadexG-100 柱层析 均一苦瓜多糖

1.2.2.1 DEAE-52 纤维素柱层析

分别称取多糖样品 900mg, 加热溶于 40ml 蒸馏水中, 离心, 将上清液加入 DEAE Cellulose-52 离子交换柱, 然后依次用蒸馏水(500ml)、0.025mol/L NaCl 水溶液(450ml)、0.05mol/L NaCl 水溶液(450ml)、0.1mol/L NaCl (350ml)、0.3mol/L NaCl (350ml)、2.0mol/L NaCl (350ml) 水溶液洗脱, 使用 HL-2 恒流泵, 控制流速为 1ml/min, 每管收集 10ml, 苯酚-硫酸法跟踪检测, 绘制洗脱曲线, 合并各吸收峰的洗脱液, 用蒸馏水透析至无 Cl^- , 减压

浓缩, 冷冻干燥, 得到上述多糖的 DEAE 柱分离物。

1.2.2.2 Sephadex G-100 柱层析

分别称取经 DEAE 柱分离得到的多糖样品 MCP_2 , MCP_4 10mg, 用 1.5ml 0.05mol/L NaCl 溶解, 离心(8000r/min), 上样。用 0.05mol/L NaCl 以 20ml/h 流速洗脱, 每管收集 4ml。收集液用苯酚-硫酸法跟踪检测, 绘制洗脱曲线, 观察吸收峰的形状, 若峰形为对称的单峰, 说明样品较纯, 若峰形不对称, 说明样品不纯, 还需进一步分离纯化。合并各吸收峰的洗脱液, 用蒸馏水透析至无 Cl^- , 减压浓缩, 冷冻干燥。

1.2.3 多糖的纯度鉴定及分子量测定

1.2.3.1 多糖纯度鉴定 取上述纯化的苦瓜多糖溶于最小体积蒸馏水中。

醋酸纤维膜电泳: 取醋酸纤维素薄膜(2×8cm), 放在硼酸缓冲液(pH8.6)中浸泡 20min, 取出吸去多余水分后点样, 点样端放在阴极, 电压 200V, 电泳 25min, 取出用 5% 甲苯胺兰染色 10min, 4% 钼酸铵固定。

凝胶色谱法: Sepharose 6B-CL 装填于 1.5×90cm 的层析柱中, 装填高度为 85cm, 用 0.1mol/L NaCl 溶液 50ml/h 的流速平衡。多糖水溶液每次加样 5ml, 0.1mol/L NaCl 溶液按 10ml/h 的流速洗脱, 每 10min 收集一管, 苯酚-硫酸法显色跟踪检测。

1.2.3.2 分子量测定 采用凝胶色谱法测定多糖的分子量。

标准曲线的制作: 分别称取平均分子量为 500、110、70、40、10kD 的 Dextran 系列标准葡聚糖 5.0mg, 用 1ml 0.1mol/L NaCl 溶解, 分别加入 Sephadex G-100 (1.5cm×90cm) 凝胶柱中, 然后用 0.1mol/L NaCl 溶液洗脱, 用 HL-2 恒流泵调节流速为 6ml/h, 用自动收集仪接收, 每 10min 接收一管, 用苯酚-硫酸法跟踪检测, 计算不同分子量的多糖经过凝胶柱的洗出体积(V_e)。再用蓝色葡聚糖(平均分子量为 2000kD)上柱求得柱的外水体积(V_0)。以 V_e/V_0 为纵坐标, 1gM 为横坐标, 得到分子量测定标准曲线。

样品分子量测定:

取多糖纯品 5mg 上样, 按与 Dextran 标准品层析相同的条件操作, 求得相应的洗脱体积, 求得 V_e/V_0 值, 查标准曲线可得多糖的分子质量。

1.2.4 多糖样品的定性分析^[3,4]

1.2.4.1 苦瓜多糖理化性质

碘-碘化钾反应: 将苦瓜多糖样品制成溶液(1mg/ml), 取 1ml 分别加入碘-碘化钾溶液, 观察颜色变化。以蒸馏水作阴性对照, 淀粉溶液(1mg/ml)作阳性对照。

茚三酮反应: 分别取 1ml 浓度为 1mg/ml 的苦瓜多糖溶液, 加入 0.5ml 的 0.1% 茚三酮乙醇溶液, 混匀, 煮

沸1~2min,冷却,观察颜色变化。以蒸馏水作阴性对照,0.5%甘氨酸溶液作阳性对照。

Molish反应:分别取1ml浓度为1mg/ml的苦瓜多糖溶液,各加入2滴Molish试剂,摇匀,将试管倾斜,沿试管壁慢慢加入1ml浓硫酸,竖直试管,观察浓硫酸和糖交界面颜色的变化。以蒸馏水作阴性对照,淀粉溶液(1mg/ml)作阳性对照。

1.2.4.2 紫外、红外光谱分析

紫外:分别配成0.5mg/ml的水溶液,在波长为200~400nm之间扫描,观察波长在280nm和260nm处有无吸收峰,确定多糖样品中是否含有蛋白质或核酸。

红外:称取纯化的多糖2mg,用KBr混合压片法在4000~500cm⁻¹范围进行扫描。

1.2.4.3 多糖的水解

各取多糖纯品20mg干燥样品,加入2.0mol/L的H₂SO₄溶液2ml,100℃水封管水解6h,取出冷却后加入BaCO₃中和,3000r/min离心除去BaSO₄沉淀,上清液减压浓缩蒸干,即获得多糖水解物-混合单糖,备用。

1.2.4.4 混合单糖的薄层层析^[5-7]

苯氨-邻苯二甲酸的配制:称取邻苯二甲酸1.6g加入100ml水饱和的正丁醇中,然后再加入0.93g苯氨(相当于0.9ml),混匀,即为显色剂。

对照品溶液的制备:精密称取L-鼠李糖、D-阿拉伯糖、D-甘露糖、D-葡萄糖、D-半乳糖、D-木糖对照品适量,加水稀释,制成5mg/ml的对照品溶液。

薄层板的制备:称取硅胶G 5g于50ml烧杯中,加入0.75% CMC-Na与0.3mol/L磷酸二氢钠混合水溶液12ml。铺制薄层板,室温下静置过夜即可,用前在110℃下活化1h。

展开系统^[8]:A:丙酮:水=9:2;B:异丙醇:乙酸乙酯:正丁醇:水=6:10:3.5:9(上层)

展开:先用A试剂展开,展距为18cm,取出晾干,再用B试剂二次展开,展距为15cm。

显色:将展开过的薄板在室温下晾至溶剂挥发干净,再在80℃烘箱中烘烤15min,将显色剂均匀喷洒在薄层板上,此板在100℃烘烤10min即可显色。

1.2.4.5 混合单糖的气相色谱分析^[5]

气相色谱分析:取多糖水解样和标准单糖各10mg依次加入盐酸羟胺10mg,内标肌醇六乙醚酯7mg,吡啶0.5ml,90℃水浴反应30min并振荡。取出后冷却至室温,加入醋酸酐0.5ml,在90℃水浴继续反应30min进行乙酰化,生成具有挥发性的糖腈乙酸酯衍生物,取样进行气相色谱分析,并根据气相色谱各峰的面积比算出摩尔比。

色谱条件:色谱柱:HP-5MS 21000mm×0.25mm×0.2μm弹性石英毛细管色谱柱;固定相:OV-225;

检测:氢火焰离子化检测器(FID);柱室起始温度130℃,保留2min,程序升温5℃/min,中止温度240℃;汽化温度250℃;检测器250℃。

2 结果与讨论

2.1 苦瓜多糖的提取、分离、纯化

苦瓜粉经乙醇回流,水提醇沉,Sevage法脱蛋白,透析,得到粗多糖。粗多糖用水复溶,得难溶组分MCP₁,水溶部分再经DEAE-52分级得到五级分MCP₂、MCP₃、MCP₄、MCP₅、MCP₆;得率分别为25.00%、10.32%、7.90%、28.80%、24.05%(图1、2)。

2.2 苦瓜多糖MCP₂和MCP₄纯度鉴定及分子量测定

MCP₂、MCP₄在SephacroseCL-6B凝胶柱上呈单一洗脱峰,醋酸纤维膜电泳结果为均一条带图4,说明MCP₂、MCP₄为均一成分。

用蓝色葡聚糖测得凝胶柱外水体积为58ml,五种标准分子质量的葡聚糖洗脱体积分别为:138ml、110ml、98ml、88ml、63ml。按Ve/V₀-lgM作图得标准曲线(图

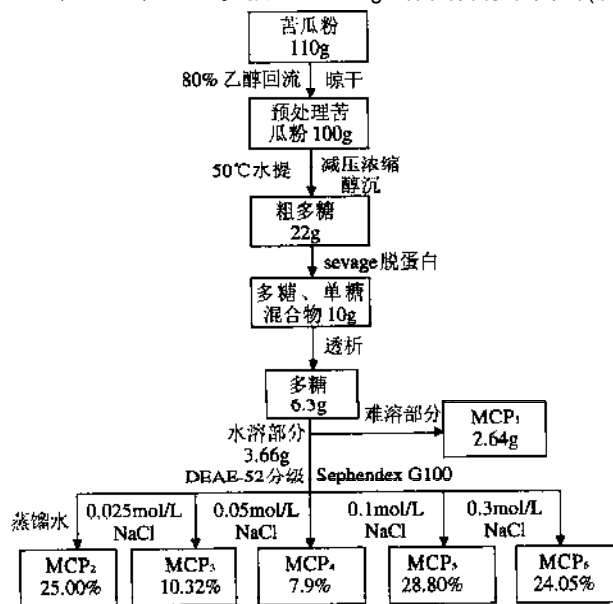


图1 苦瓜多糖的分离、纯化流程

Fig.1 Technological process of extraction isolation and purification

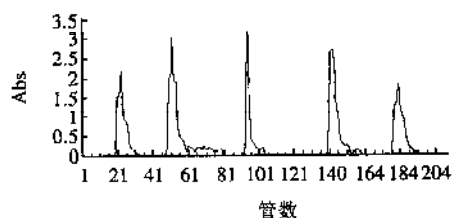


图2 苦瓜多糖 DEAE-52 柱层析洗脱曲线

Fig.2 Elution result of MC on DEAE-52 Cellulose column

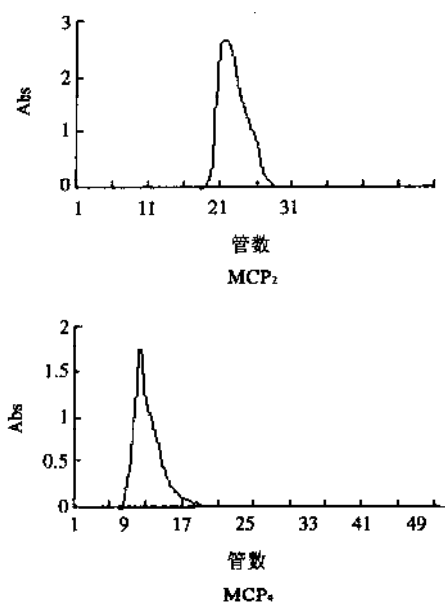


图3 苦瓜果糖 Sephadex G-100 柱层析柱层析洗脱曲线
Fig.3 Elution result of MCP₂ and MCP₄ on Sephadex G-100 column

5), $Y = -0.7664X + 5.4180$ ($n=5$, $R^2=0.9952$).



图4 MCP₄ 醋酸纤维素膜电泳结果
Fig.4 Figure of cellulose acetate membrane electrophoresis of MCP₄

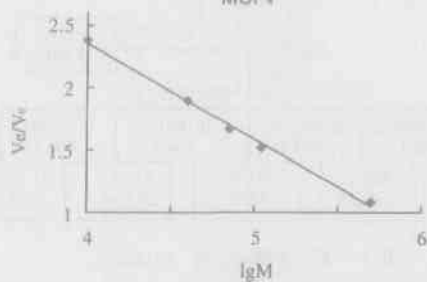


图5 多糖分子量测定标准曲线
Fig.5 Standard curve of molecular weight by gel filtration

经凝胶层析测定, MCP₂ 洗脱体积为 104ml, 计算得它的平均分子量为 53700D。MCP₄ 洗脱体积为 92.7ml, 平均分子量分别为 96500D。

2.3 苦瓜果糖 MCP₂ 和 MCP₄ 的定性分析

2.3.1 苦瓜果糖理化性质

MCP₂ 和 MCP₄ 二种样品的碘 - 碘化钾反应、茚三酮

均呈阴性, 说明样品中不含淀粉、氨基酸和蛋白质; 二种样品的 Molish 反应反应均呈阳性, 说明样品中含糖。

2.3.2 紫外、红外分析

在 260、280nm 处没有吸收峰, 说明二种样品均不含蛋白质和核酸。

MCP₂ 和 MCP₄ 的红外光谱分析(图 6) 可以看出, 3422cm⁻¹ 为多糖的 O-H 的伸缩振动, 存在分子间和分子内氢键; 2919cm⁻¹ 吸收为糖样的 C-H 伸缩振动峰; 1613cm⁻¹ 是 C=O 的非对称伸缩振动峰, 1050cm⁻¹ 为 C-H 的变角振动峰, 886cm⁻¹ 是 -D- 吡喃糖特征吸收, 769cm⁻¹ 由吡喃糖对称环伸缩振动所致。MCP₂: 882cm⁻¹ 为 -D- 半乳糖吡喃糖吸收峰。

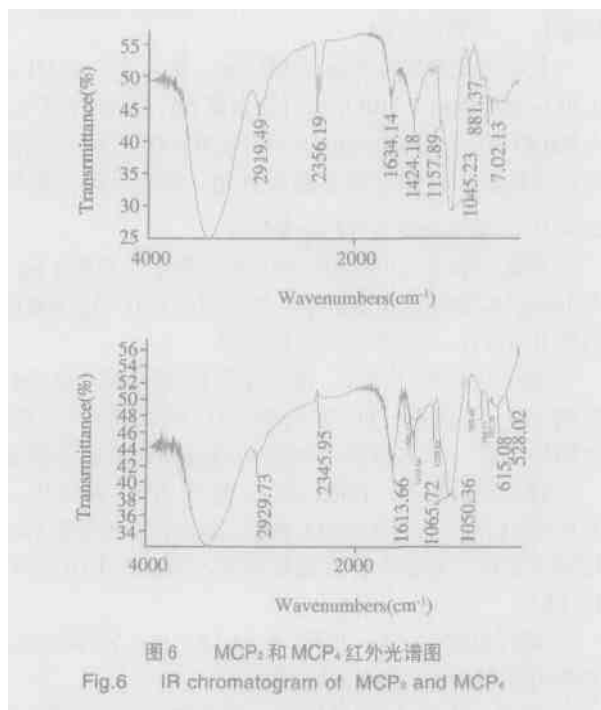


图6 MCP₂ 和 MCP₄ 红外光谱图
Fig.6 IR chromatogram of MCP₂ and MCP₄

2.3.3 混合单糖的薄层层析

鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖的 R_f 值分别为 0.84、0.59、0.37、0.36、0.30、0.22。其中木糖、阿拉伯糖斑点呈棕红色, 其它均为棕黄色。

MCP₄ 由鼠李糖、木糖、阿拉伯糖和半乳糖组成的杂多糖, 其水解物的 R_f 值与标准单糖 R_f 值基本一致。MCP₂ 是由半乳糖组成。

2.3.4 气相色谱

各种标准单糖、MCP₂、MCP₄ 的气相色谱见图 7、图 8、表 1。结果表明, 苦瓜果糖 MCP₂ 是半乳糖, 苦瓜果糖 MCP₄ 是由鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖和木糖组成的杂多糖, 与 TLC 结果一致, 其摩尔比为: 1:0.75:0.25:1.83:0.85。

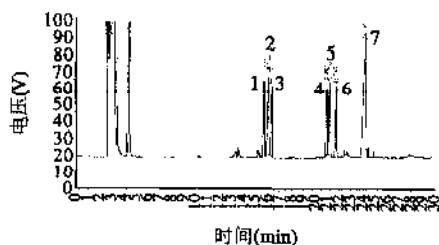


图7 各种标准单糖的气相色谱图

Fig.7 GC chromatogram of glycosyl-nitile acetate derivatives of standard monosaccharide

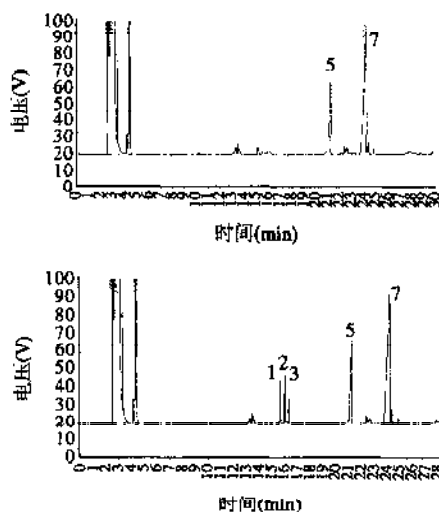
图8 MCP₂和MCP₄的气相色谱图Fig.8 GC chromatogram of glycosyl-nitile acetate derivatives of polysaccharide MCP₂ and MCP₄

表1 苦瓜多糖的单糖组成分析结果

Table 1 Monosaccharide composition of polysaccharide MCP₂ and MCP₄

	L-鼠李糖	D-阿拉伯糖	D-葡萄糖	D-半乳糖	D-木糖
MCP ₂ (%)	/	/	/	100	/
MCP ₄ (%)	24.3	16.47	6.72	41.55	11.23

3 结论

本文研究了苦瓜多糖的分离、纯化方法，并对其

组成进行了初步分析。苦瓜经水浸提、乙醇沉淀、Sevage 法脱蛋白、得到多糖粗品：水难溶部分MCP₁。多糖粗品水溶部分进一步经 DEAE-52 纤维素层析和 SephadexG-100 柱层析，得到MCP₂、MCP₃、MCP₄、MCP₅、MCP₆，其得率分别为 25.00%、10.32%、7.90%、28.80%、24.05%。对其中主要水溶性组分MCP₂，MCP₄经醋酸纤维膜电泳和凝胶柱层析鉴定为均一的多糖组分。经紫外分析，MCP₂、MCP₄中不含蛋白质、核酸。经薄层和气相色谱分析表明苦瓜中性多糖MCP₂是半乳聚糖，酸性多糖MCP₄是由鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、木糖和葡萄糖组成的杂多糖。红外色谱分析，含有 - D - 吡喃糖苷键。经凝胶层析测定它们的平均分子量分别为 53700D、96500D。

参考文献：

- [1] JKGrover, SPYadav. Pharmacological actions and potential uses of Momordica charantia: a review[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2004, 93(1):123-132.
- [2] 刘金福, 张平平. 苦瓜多糖提取工艺的研究[J]. 天津农学院学报, 2003, 10(3): 30-33.
- [3] 程霜, 崔庆新, 王勇. 水溶性苦瓜多糖的提取与测定[J]. 郑州粮食学院学报, 2000, 21(2): 53-56.
- [4] 王习达, 吴国荣, 陈景耀. 铜绿微囊藻酸性多糖的分离、纯化与结构研究[J]. 中药材, 2003, 2(12): 865-868.
- [5] Zhang WJ. Biochemical study technics of polysaccharide [M]. 2nded, Hangzhou: Zhe-jiang University Publishing House, 1999.
- [6] KYLee, CFPoole, AZIlatkis, et al. Determination of glucose, fructose and sucrose in malasses by high-performance thin-layer chromatography[J]. Chromatogr, 1979, 174: 187-193.
- [7] Rokus A D Z. Rapid analysis of simple carbohydrates by means of vapour-programmed thin-layer chromatography and densitometry and using a new spotting device[J]. Chromatogr, 1975, 110: 279-286.
- [8] 胡闻莉, 刘文英, 严永清, 等. 生脉散多糖的组成及其初级结构分析[J]. 中国药科大学报, 2002, 33(1): 38-41.

信息

陕西新技术使食用油可做汽车燃料

将普通的花生油、菜籽油、100%的甲醇加入汽车油箱，汽车就可以正常发动行驶，并且对发动机没有任何损害。这是应用陕西四维高科滤材股份有限公司自主研发生产的FDL系列过滤器实现的。

随着全球能源危机的加剧，世界各国都在积极开发醇类及生物类燃料。据介绍，FDL系列滤清器可将醇类燃料在发动机做功时不断产生的酸性物质进行吸附、过滤；同时以缓释的方式将滤材中所含有的多种稀土元素释放于燃油中，提高燃油的品质、增加动力、降低油耗，并可在对发动机不需进行大的改造前提下，即可燃烧100%的纯植物油和醇类燃料。